

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2000年12月14日 (14.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 00/75150 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07F 9/144, 9/655, 9/6561, C07D  
493/10, A61K 31/661, 41/00, A61P 43/00

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 長野哲雄 (NAGANO, Tetsuo) [JP/JP]; 〒167-0032 東京都杉並区天沼1-28-15 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03344

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2000年5月25日 (25.05.2000)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 菊地和也 (KIKUCHI, Kazuya) [JP/JP]; 〒247-0007 神奈川県横浜市栄区小菅谷1-5-1-315 Kanagawa (JP). 井上尊生 (INOUE, Takanari) [JP/JP]; 〒210-0831 神奈川県川崎市川崎区観音2-4-2 Kanagawa (JP). 飯野正光 (IINO, Masamitsu) [JP/JP]; 〒114-0014 東京都北区田端3-25-17-401 Tokyo (JP). 廣瀬謙造 (HIROSE, Kenzo) [JP/JP]; 〒113-0033 東京都文京区本郷1-35-27-602 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/154528 1999年6月2日 (02.06.1999) JP

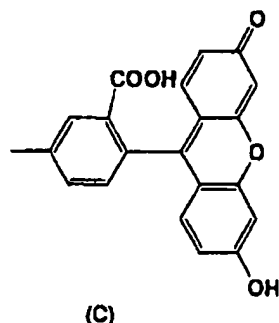
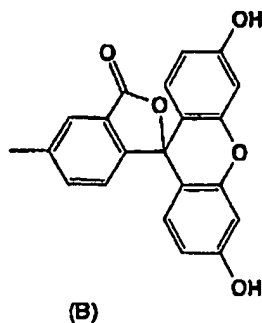
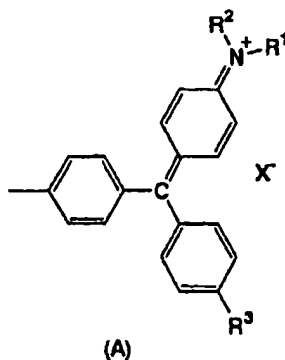
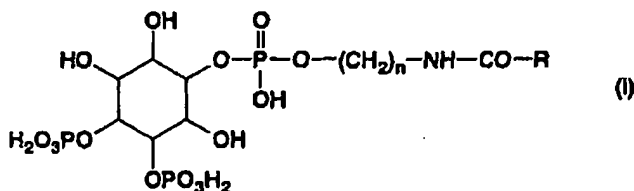
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 今村正純, 外 (IMAMURA, Masazumi et al.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: IP<sub>3</sub> RECEPTOR LIGANDS

(54) 発明の名称: IP<sub>3</sub>受容体リガンド



(57) Abstract: Compounds of general formula (I) or salts thereof, useful as ligands to inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptor, wherein R is a group represented by general formula (A), (B) or (C) (wherein R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> are each independently C<sub>1-6</sub> alkyl; R<sup>3</sup> is amino, mono(C<sub>1-6</sub> alkyl)amino, di(C<sub>1-6</sub> alkyl)amino, or C<sub>1-6</sub> alkoxy; and X<sup>-</sup> is an anion; and n is an integer of 2 to 5).

[続葉有]



(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

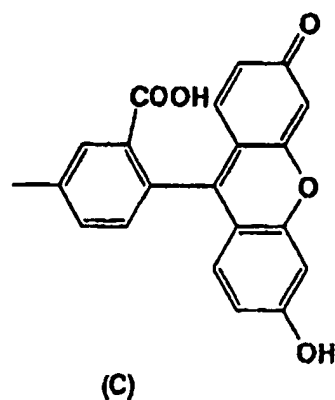
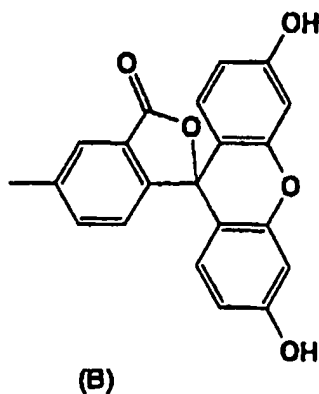
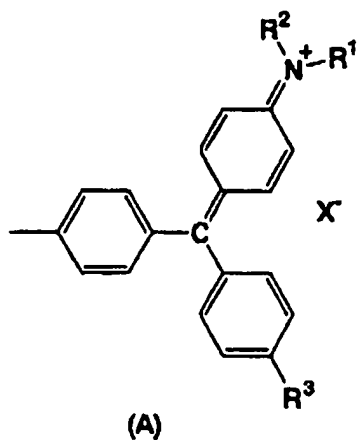
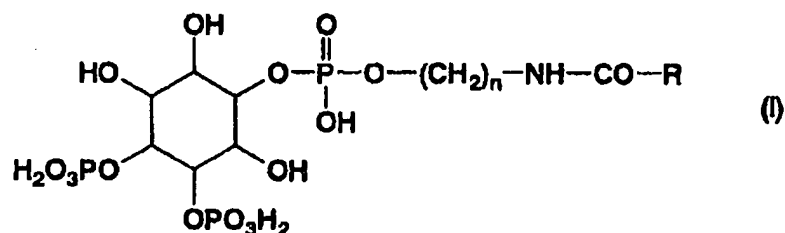
2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

一般式(I)〔Rは下記の式(A)、(B)、又は(C) (式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>はそれぞれ独立にC<sub>1-6</sub>アルキル基を示し、R<sup>3</sup>はアミノ基、モノC<sub>1-6</sub>アルキルアミノ基、ジC<sub>1-6</sub>アルキルアミノ基、又はC<sub>1-6</sub>アルコキシ基を示し、Xはアニオン種を示す)で表される基を示し、nは2~5の整数を示す〕で表される化合物又はその塩。イノシトール1,4,5-トリスリン酸(IP<sub>3</sub>)受容体のリガンドとして有用である。



## 明 細 書

I P<sub>3</sub>受容体リガンド

## 技術分野

本発明は、イノシトール 1,4,5-トリスリン酸受容体のリガンドに関するものである。

## 背景技術

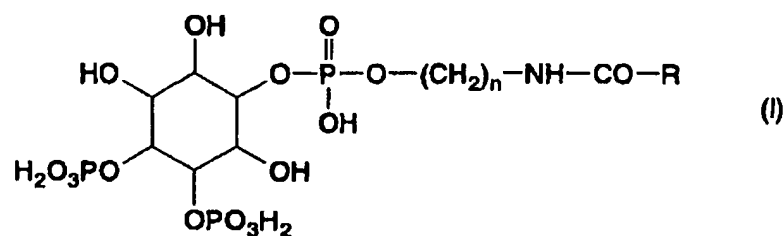
D-myo-イノシトール 1,4,5-トリスリン酸（本明細書において「I P<sub>3</sub>」と略す場合がある。）は I P<sub>3</sub>受容体に結合して Ca<sup>2+</sup>の細胞内貯蔵部位から Ca<sup>2+</sup>を遊離させるセカンドメッセンジャーであり、多様な細胞において細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の動力学を制御している。I P<sub>3</sub>は、例えば、分泌、受精、筋収縮、神経シグナル伝達および細胞成長などの種々の細胞機能の制御に重要な役割を演じている（Berridge, M.J., *Nature*, 361, 315, 1993; Clapham, D.E., *Cell*, 80, 259, 1995）。

I P<sub>3</sub>が惹起するシグナル伝達を研究するために多くの I P<sub>3</sub>アナログが合成されており（Li, W., et al., *Nature*, 392, 936, 1998; McCarren, M. et al., *J. Neuron*, 3, 461, 1989）、I P<sub>3</sub>受容体および他の I P<sub>3</sub>結合タンパクの構造が検討されているが（Mourey, R. J. et al., *Biochemistry*, 32, 1719, 1993）、I P<sub>3</sub>の1位のリン酸を修飾しても、I P<sub>3</sub>受容体への結合親和性にはほとんど影響がないことが報告されている（Schafer, R., et al., *Biochem. J.*, 272, 817, 1990; Prestwich, G. D. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 1822, 1991）。なお、*Penicillium breviocompactum* の培養液から単離した代謝産物であるアデノホスチン類が I P<sub>3</sub>受容体に対する最も強力なアゴニストであることが知られている（Takahashi, M., et al., *J. Biol. Chem.*, 269, 369, 1994）。

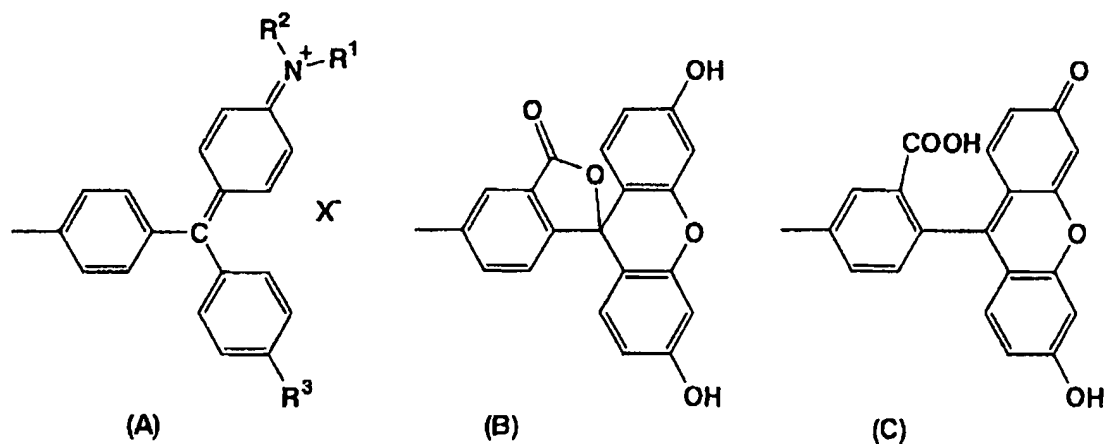
## 発明の開示

本発明者らは、新規な  $IP_3$  受容体リガンドを提供すべく鋭意研究を行った結果、予期しなかったことに、 $IP_3$  の 1 位のリン酸をマラカイトグリーンやフルオレセインなどの色素誘導体又は蛍光色素誘導体で修飾することにより、 $IP_3$  受容体に対して極めて高い親和性を有する化合物を提供できることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明は、下記の一般式(I)：

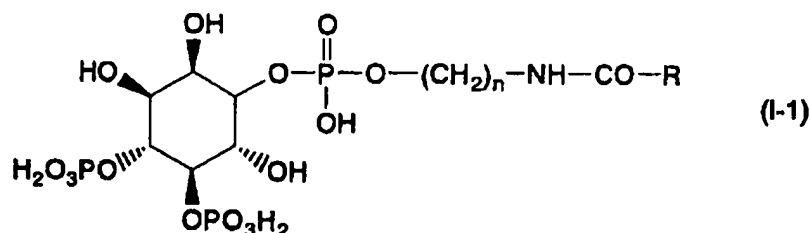


〔式中、R は下記の式 (A)、(B)、又は(C)：



(式中、 $R^1$  及び  $R^2$  はそれぞれ独立に  $C_{1-6}$  アルキル基を示し、 $R^3$  はアミノ基、モノ  $C_{1-6}$  アルキルアミノ基、ジ  $C_{1-6}$  アルキルアミノ基、又は  $C_{1-6}$  アルコキシ基を示し、 $X$  はアニオン種を示す) で表される基を示し、 $n$  は 2~5 の整数を示す) で表される化合物又はその塩を提供するものである。

本発明の好ましい態様によれば、一般式(I)で表される化合物が下記の式(I-1):



(式中、R は上記と同義である) で表される上記化合物又はその塩; R が上記の式(A) (式中、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> がメチル基であり、R<sup>3</sup> がジメチルアミノ基であり、X が塩素イオンである) で表される基であり、n が 3 である上記化合物又はその塩; 及び、R が上記の式(A) (式中、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> がメチル基であり、R<sup>3</sup> がジメチルアミノ基であり、X が塩素イオンである) で表される基であり、n が 3 である上記化合物又はその塩が提供される。

別の観点からは、上記一般式(I)で表される化合物又はその塩を含む I P<sub>3</sub> 受容体リガンドが提供される。この I P<sub>3</sub> 受容体リガンドを I P<sub>3</sub> 受容体に結合させた後に光照射することによって、I P<sub>3</sub> 受容体を変性させることができる。従って、上記一般式(I)で表される化合物又はその塩を含む I P<sub>3</sub> 受容体リガンドは、I P<sub>3</sub> 受容体の変性用試薬として有用である。また、上記一般式(I)で表される化合物又はその塩を含む医薬が本発明により提供される。この医薬は、I P<sub>3</sub> 過剰や I P<sub>3</sub> 受容体の過剰発現に起因する疾患の予防及び/又は治療剤として有用である。

さらに別の観点からは、上記一般式(I)で表される化合物又はその塩と I P<sub>3</sub> 受容体とを結合させた後に光照射する工程を含む I P<sub>3</sub> 受容体の変性方法が本発明により提供される。また、本発明により、好ましくは上記の方法により I P<sub>3</sub> 受容体を変性させた細胞又は細胞抽出液が提供される。

#### 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明の化合物が I P<sub>3</sub> 受容体リガンドとして作用することを示し

た図である。図中、(A) は IBD 及び BSA によって惹起される表面プラズモン共鳴の結果を示す。(B) は  $IP_3$ 、化合物 1、化合物 2a、及び化合物 2b の競合アッセイの結果を示し、これらの化合物によって化合物 1 固定化チップへの IBD の結合が阻害されたことを示している。(C) は IBD 低濃度における化合物 2b 及びカルボキシマラカイトグリーン (CMG) の競合アッセイの結果を示す。IBD 濃度は 52.8 nM(B)又は 1.76 nM(C)である。

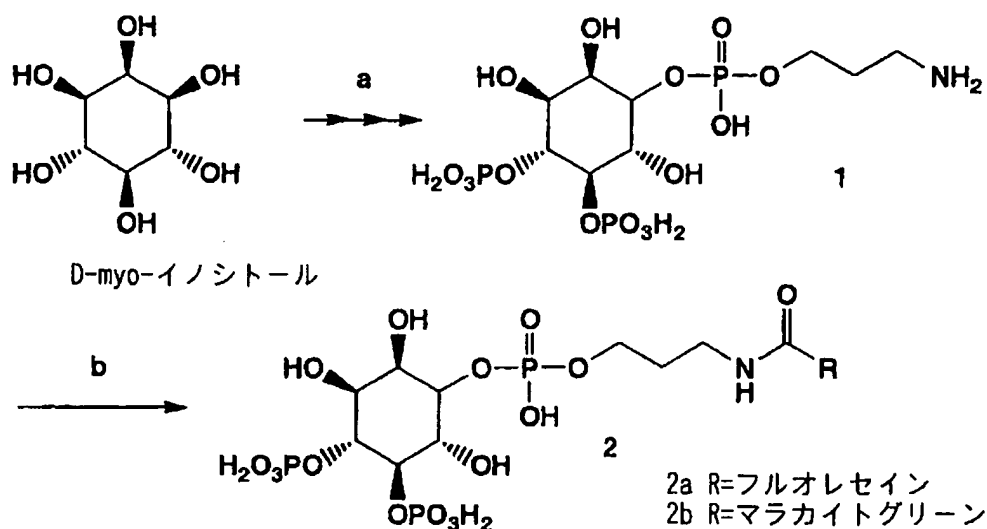
第 2 図は、本発明の化合物を  $IP_3$  受容体に結合させた後、光照射することにより  $IP_3$  受容体を変性できることを示した図である。図 2A は、レーザー照射の前後で  $IP_3$  により惹起される  $Ca^{2+}$  放出活性の抑制が認められた結果を示し：図 2B はレーザー照射時間を変化させると、照射時間依存的に  $Ca^{2+}$  放出活性が抑制された結果を示し；図 2C は、化合物 2b の添加もレーザー照射もない条件での放出活性と比較して、レーザー照射のみ、あるいは化合物 2b の添加のみの条件では  $Ca^{2+}$  放出活性の低下は認められなかったが、化合物 2b の添加とレーザー照射の両方を実施した場合には顕著な  $Ca^{2+}$  放出活性の低下が認められたことを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

$R^1$  及び  $R^2$  が示す  $C_{1-6}$  アルキル基は、直鎖状、分枝鎖状、環状、又はそれらの組み合わせのいずれでもよい。例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、シクロブチル基、シクロプロピルメチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、シクロヘキシル基などを用いることができる。 $R^1$  及び  $R^2$  がメチル基であることが好ましい。 $R^3$  が示すモノ  $C_{1-6}$  アルキルアミノ基又はジ  $C_{1-6}$  アルキルアミノ基におけるアルキル基、及び  $C_{1-6}$  アルコキシ基におけるアルキル部分としては、上記に説明した  $C_{1-6}$  アルキル基を用いることができる。 $R^3$  としてはジメチルアミノ基が好ましい。 $X$  はアニオン種を示し、その種類は特に限定されないが、例えば、塩素イオンなどのハロゲンイオンが好ましい。 $n$  は 2~5 の整数を示すが、 $n$  が 3 であることが好ましい。 $R$  としては、マラカイトグリーンの残基である上記式(A)で表され

る基が好ましい。

上記式(1)で表される本発明の化合物は、下記のスキームに従って製造することができる。



(スキーム中、n が 3 の化合物の製造を記載した)

D-myo-イノシトールから 14 工程で 1D-1-0-(3-アミノプロピル-1-ホスホ)-myo-イノシトール 4,5-ビスリン酸 (化合物 1 : Strupish, J., et al., Biochem. J., 253, 901, 1988) を製造することができる (Prestwich, G. D., et al., J. Am. Chem. Soc., 113, 1822, 1991; Ozaki, S., et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1992, 729; Gigg, J., et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 423, 1987; Bannwarth, W., et al., Helv. Chim. Acta, 70, 175, 1987)。この化合物 1 に対して、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドとフルオレセイン誘導体又はマラカイトグリーン誘導体とのエステルなどを反応させることにより、本発明の化合物を製造することができる。例えば、0.1M NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液 (pH 8.3) 中に溶解した化合物 1 に対して、ジメチルホルムアミドなどの溶媒の共存下で上述の N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを加え、遮光下に室温で 2~3 時間反応させればよい。

N-ヒドロキシスクシンイミドエステル化して得た 4-カルボキシマラカイトグ

リン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (CMG-SE) は、例えば、4-カルボキシベンズアルデヒド (1 当量) とジメチルアニリン (2 当量) との酸縮合物で塩酸 N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) の存在下で N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) をアシル化し、続いて 2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン (DDQ) で酸化することにより得ることができる。5-カルボキシフルオレセイン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (CF-SE) は市販のものを入手することができる (例えば、Research Organics, Inc. 製)。

式(I)で表される本発明の化合物は、塩を形成する場合があるが、いかなる塩も本発明の範囲に包含される。また、分子内で対イオン (ツビッターイオン) を形成する場合がある。本発明の化合物は、置換基の種類に応じて 1 個又は 2 個以上の不斉炭素を有する場合があるが、光学活性体やジアステレオ異性体などの立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などは、いずれも本発明の範囲に包含される。また、R で表される基については、互変異性体が存在する場合もあるが、それらはいずれも本発明の範囲に包含される。さらに、遊離形態の本発明の化合物又はその塩は水和物又は溶媒和物として存在する場合があるが、これらの物質も本発明の範囲に包含される。

上記一般式(I)で表される化合物は、 $IP_3$  受容体に対して高い親和性を有しており、 $IP_3$  受容体リガンドとして有用である。本発明の化合物は発色団又は蛍光団を有しているので、例えば、 $IP_3$  受容体に対する被検物質の親和性を測定するための蛍光試薬として用いることができる。その方法の具体例を本明細書の実施例に詳細に示した。また、本発明の化合物を  $IP_3$  受容体と結合させた後、光照射することにより、本発明の化合物が結合した  $IP_3$  受容体を変性させることができる。例えば、培養細胞、培養組織、又は細胞抽出物などに対して本発明の化合物の存在下で光照射することにより、イン・ビトロにおいて  $IP_3$  受容体を変性させることができる。また、本発明の化合物をヒトを除く哺乳類動物に投与し、光照射することによって生体内で  $IP_3$  受容体を変性させ、 $IP_3$  受容体の機能が低下ないし停止した実験動物を作出することもできる。



さらに、 $IP_3$ 過剰や $IP_3$ 受容体の過剰発現に起因する疾患の治療のために、本発明の化合物をヒトを含む哺乳類動物に医薬として投与し、光照射することにより、生体内で $IP_3$ 受容体の機能を低下させて疾患を治療することができる。従って、本発明により、上記 $IP_3$ 受容体リガンドと $IP_3$ 受容体とを結合させた後に光照射する工程を含む $IP_3$ 受容体の変性方法、 $IP_3$ 受容体を変性させた細胞又は細胞抽出物、及び上記 $IP_3$ 受容体リガンドを含む $IP_3$ 受容体の変性剤が提供される。 $IP_3$ 受容体変性のための光照射は、上記 $IP_3$ 受容体リガンドの色素誘導体又は蛍光色素誘導体の特性にあわせて条件を選択することができる。通常は620nm程度あるいは500nm程度の細胞に影響を与えない長波長のレーザー光を用いて行うことができる。

本発明の医薬は、上記の式(I)で表される化合物及びその塩、並びにそれらの水和物及び溶媒和物からなる群から選ばれる物質の1種または2種以上を有効成分として含んでいる。本発明の医薬としては上記物質それ自体を投与してもよいが、好ましくは、医薬組成物として投与することができる。医薬組成物の形態は特に限定されず、1又は2以上の適宜の製剤用添加物を用いて、経口投与用又は非経口投与用の医薬組成物を製造して使用することができる。経口投与に適する医薬用組成物としては、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、液剤、及びシロップ剤等を挙げることができ、非経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、注射剤、坐剤、吸入剤、点眼剤、点鼻剤、軟膏剤、クリーム剤、及び貼付剤等を挙げることができる。

上記の医薬組成物は、薬理学的、製剤学的に許容しうる添加物を加えて製造することができる。薬理学的、製剤学的に許容しうる添加物の例としては、例えば、賦形剤、崩壊剤ないし崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤ないし溶解補助剤、等張化剤、pH調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等を挙げることができる。

本発明の医薬の投与量は特に限定されず、その作用の種類や作用の強弱などに応じて適宜選択することができ、さらに患者の体重や年齢、疾患の種類や症状、

投与経路など通常考慮すべき種々の要因に応じて、適宜増減することができる。例えば、経口投与の場合には成人一日あたり 0.01 ~1,000 mg 程度の範囲で用いることができる。本発明の医薬を投与した後、生体内  $IP_3$  受容体の機能を低下させるために十分な強度の光照射を行うことによって、 $IP_3$  過剰や  $IP_3$  受容体の過剰発現に起因する疾患の治療及び／又は予防を行うことができる。光照射の強度及び頻度は、本発明の医薬の投与量及び投与方法、疾患の種類、患者の体重や年齢などに応じて当業者が適宜選択可能である。

## 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

### 例 1 : 化合物の製造

1D-1-0-(3-アミノプロピル-1-ホスホ)-myo-イノシトール 4,5-ビスリン酸 (上記スキーム中の化合物 1 : Strupish, J., et al., Biochem. J., 253, 901, 1988) を文献記載の方法に従って製造した (Prestwich, G. D., et al., J. Am. Chem. Soc., 113, 1822, 1991; Ozaki, S., et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1992, 729; Gigg, J., et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 423, 1987; Bannwarth, W., et al., Helv. Chim. Acta, 70, 175, 1987)。4-カルボキシベンズアルデヒド (1 当量) とジメチルアニリン (2 当量) との酸縮合産物をアシル化剤として、塩酸 N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) の存在下で、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) をアシル化した。次に、2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン (DDQ) で酸化し、4-カルボキシマラカイトグリーン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (CMG-SE) を得た。

0.1M NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液 (pH 8.3) 中の化合物 1 に、5-カルボキシフルオレセイン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (CF-SE, Research Organics, Inc.) 又は CMG-SE を加えた後、反応混合物を室温で 2~3 時間攪拌し、上記スキーム中の化合物 2a 及び 2b をそれぞれ得た。CMG-SE、化合物 2a 及び 2b は C<sub>18</sub> 逆相 HPLC で精

製した。上記化合物の光学純度は、1D-4,5-ジ-0-アリル-3,6-ジ-0-ベンジル-1-1-メトキシアセチル-myo-イノシトール（1の中間体）の比旋光度から算出した（Ozaki, S., et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 729, 1992）。

化合物のスペクトルデータ（Radenberg, T., et al., Biochem. J., 264, 323, 1989）：

1D-4,5-ジ-0-アリル-3,6-ジ-0-ベンジル-1-1-メトキシアセチル-myo-イノシトール： $[\alpha]^{25}_D = -52.5$  (c 2.2, CHCl<sub>3</sub>):

4-カルボキシマラカイトグリーン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (CMG-SE)：<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  2.96 (s, 4H), 3.37 (s, 12H), 6.96 (d, J = 8.79 Hz, 4H), 7.37 (d, J = 8.79 Hz, 4H), 7.49 (d, J = 8.22 Hz, 2H), 8.29 (d, J = 8.22 Hz, 2H); FABMS 470(M)<sup>+</sup>

化合物 2a：<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  1.88 (m, 2H), 3.46 (m, 2H), 3.58 (dd, J = 2.37, 9.78 Hz, 1H), 3.77 (t, J = 9.15 Hz, 1H), 3.87-4.00 (m, 4H), 4.14 (t, J = 2.19 Hz, 1H), 4.22 (dd, J = 8.79, 9.69 Hz, 1H), 6.96 (dd, J = 2.19, 9.24 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 2.19 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 9.15 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 7.71 Hz, 1H), 8.07 (dd, J = 1.65, 7.95 Hz, 1H), 8.50 (d, J = 1.11 Hz, 1H); FABMS 836 (MH)<sup>+</sup>

化合物 2b：<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  1.80 (m, 2H), 3.14 (s, 12H), 3.35 (m, 2H), 3.47 (dd, J = 2.58, 9.80 Hz, 1H), 3.69 (t, J = 9.54 Hz, 1H), 3.82-3.97 (m, 4H), 4.07 (t, J = 2.91 Hz, 1H), 4.21 (dd, J = 6.21, 9.54 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 8.25 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.79 Hz, 4H), 7.46 (d, J = 8.97 Hz, 4H), 7.59 (d, J = 8.43 Hz, 2H); FABMS 832 (M)<sup>+</sup>

## 例2：結合アッセイ

### (1) ヒト I P<sub>3</sub> 受容体 1 型の発現および精製

ヒト I P<sub>3</sub> 受容体 1 型 (Yamada, N., et al., Biochem. J., 302, 781, 1994)  
の I P<sub>3</sub> 結合ドメイン (IBD、アミノ酸残基 1-885) (Mignery, G. A., et al., EMBO

J., 9, 3893, 1990) を細菌で発現させるために pGEX2T (Amersham Pharmacia) にサブクローニングした。IBD の N-末端をリンカー配列である Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser でグルタチオン S-トランスフェラーゼに融合させ、一方、IBD の C-末端はリンカー配列の Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser で His を標識した。大腸菌 BL-21 (DE3) 中で発現させた後、Ni-NTA を固定化した樹脂 (Amersham Pharmacia) 及び化合物 1 が結合した HiTrap NHS-活性化アフィニティーカラム (Amersham Pharmacia) を用いて組換えタンパクを精製した。タンパクの純度は SDS-PAGE から 22% と算定した。

### (2) 表面プラズモン共鳴の測定

BIACore 2000 (Amersham Pharmacia) を用いて、表面プラズモン共鳴 (SPR) の測定を行った。NHS および EDC で活性化した後、CM5 センサーチップの表面に、100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 中の 10 mM の化合物 1 を結合させ、エタノールアミンで不活化した。I P<sub>3</sub>、化合物 1、化合物 2a、及び化合物 2b の解離定数を求めるために、それぞれの化合物と共に、予め精製した IBD を通液緩衝液 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA、及び 0.005% Tween 20、pH 7.4) 中に溶解した。サンプル注入後、チップ表面を 100 mM NaOH で再生した。

IBD は濃度に依存してチップと結合したが、BSA (またはグルタチオン S-トランスフェラーゼ) との非特異的な結合は見られなかった。この結果から、様々な濃度の IBD またはウシ血漿アルブミン (BSA、図 1A) の注入によって、化合物 1 の固定化センサーチップが我々のアッセイに好適であることが確認された。I P<sub>3</sub>、化合物 1、化合物 2a、及び化合物 2b の IBD に対する親和性を測定するために、以下の競合アッセイを行った。IBD (52.8 nM) を種々の濃度の上記化合物と混合した。チップ上に注入すると、化合物 1 と競合する化合物は IBD に結合してチップ表面に固定化された (図 1B)。これらのアッセイから得られた SPR を等式にあてはめて化合物の解離定数 ( $K_d$ ) を計算した。

### (3) 解離定数の計算

化合物の  $K_d$  を計算するために、図 1B 及び 1C にプロットした得られたデータ

を式にあてはめた。式： $100[1 - \{X + Y + K_d - \{X^2 + 2X(K_d - Y) + (K_d + Y)^2\}^{1/2}\} / 2Y]$  ここで、X および Y はそれぞれ化合物の濃度および IBD 濃度である。化合物 2b の  $K_d$  は、IBD 濃度の半分よりもかなり小さいために正確に計算することができなかった。従って、IBD 濃度を 1.76 nM に下げて、化合物 2b の競合アッセイを再度行った (図 1C)。結合アッセイを明条件下および暗条件下で実施し、結合が光の影響を受けないことを確認した。化合物 2b の  $IP_3$  受容体に対する非特異的結合を算定するために、カルボキシマラカイトグリーン (CMG、化合物 2b の疎水性部分) を競合アッセイ中に注入したが (図 1C)、非特異的結合は認められなかった。従って化合物 2b は特異的に  $IP_3$  受容体に結合することが示された。

化合物 1 の親和性は  $IP_3$  の約 1/6 であったが (Prestwich, G. D., et al., J. Am. Chem. Soc., 113, 1822, 1991)、化合物 2a の親和性は  $IP_3$  と同等であり、化合物 2b は  $IP_3$  の 167 倍の親和性を有していた (表 1)。

表 1

化合物	$K_d$ [nM]
$IP_3$	195
1	1100
2a	188
2b	1.17

### 例 3：本発明の化合物を用いた光照射による $IP_3$ 受容体の変性

#### (1) 組織標本の作製

雄モルモット (体重 200-300 g) の門脈より調製した短冊状平滑筋組織をステンレスワイヤーに固定し、組織標本を作成した。

#### (2) $Ca^{2+}$ 放出活性の測定

前記標本を  $Ca^{2+}$  蛍光指示薬 mag-fura-2 AM (Molecular Probes) 40  $\mu$ M 溶液中 35°C で 3.5 時間インキュベートし、mag-fura-2 AM を標本に取り込ませた。ついで、界面活性剤  $\beta$ -escin 40-60  $\mu$ M 溶液中、35°C で 1.5~2 時間インキュベートし細胞内小器官以外に存在する mag-fura-2 AM を除去した。

前記標本をガラスキャピラリーに挿入し、各種溶液を前記標本に添加した際の蛍光強度比(Ex.340 nm, Em.480 nmの蛍光強度/Ex.375 nm, Em.480 nmの蛍光強度)の初期変化(放出速度)を指数関数にフィットさせて $\text{Ca}^{2+}$ の放出活性として求めた。蛍光光度計はCAF-110 (JASCO)を使用した。

### (3)本発明の化合物を用いた光照射による $\text{IP}_3$ 受容体の変性方法

前記(1)で作成した組織標本に $1\mu\text{M}$ の $\text{IP}_3$ を添加して $\text{Ca}^{2+}$ 放出活性を測定した(照射前)。測定後、該標本を蛍光光度計から取り外し、キャピラリー内を $1\mu\text{M}$ の化合物2bの溶液で満たした。ついで、該標本をビベッティングして乾燥を避けながら3分間レーザーを照射した。

レーザー照射後、該標本を再び蛍光光度計に取り付け $1\mu\text{M}$ の $\text{IP}_3$ を添加して $\text{Ca}^{2+}$ 放出活性を測定し、照射前の値と比較した(照射後)。なお、標本を蛍光光度計から取り出し、化合物2bを添加後、レーザー照射するまでに2.5分、レーザー照射終了後、再び蛍光光度計に戻すまでに1.5分を要した(すなわち作業時間は照射時間+4分)。レーザーを照射しないコントロール実験は標本に化合物2bを添加し2.5分後にビベッティングのみ3分行い、1.5分放置した後、測定を再開した。また、照射時間の変動を検討する試験では、照射時間0分は標本を化合物2b溶液で満たし、4分放置した後に測定を再開した。レーザーはYAG:Nd-pumped dye laser (wavelength 635 nm, pulsed 2-4 ns, 15 mJ per pulse at 10Hz, 3 mm diameter laser spot, Continuum)を使用した。

レーザー照射の前後で $\text{IP}_3$ により惹起される $\text{Ca}^{2+}$ 放出活性の抑制が認められた(図2A)。レーザー照射時間を変化させると、照射時間依存的に $\text{Ca}^{2+}$ 放出活性が抑制された(図2B)。化合物2bの添加もレーザー照射もない条件での放出活性と比較して、レーザー照射のみ、あるいは化合物2bの添加のみの条件では $\text{Ca}^{2+}$ 放出活性の低下は認められなかったが、化合物2bの添加とレーザー照射の両方を実施した場合には顕著な $\text{Ca}^{2+}$ 放出活性の低下が認められた(図2C)。

以上の結果から、本発明の化合物を $\text{IP}_3$ 受容体と結合させた後、光照射することにより、本発明の化合物が結合した $\text{IP}_3$ 受容体を変性させることができること

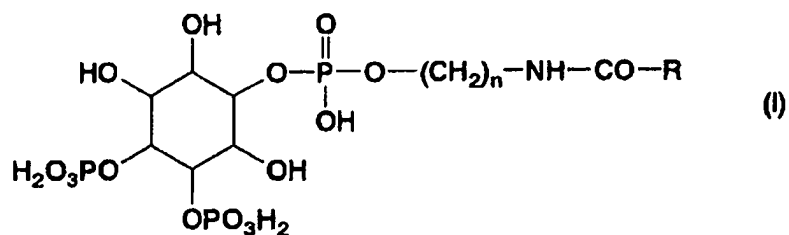
が確認された。

#### 産業上の利用可能性

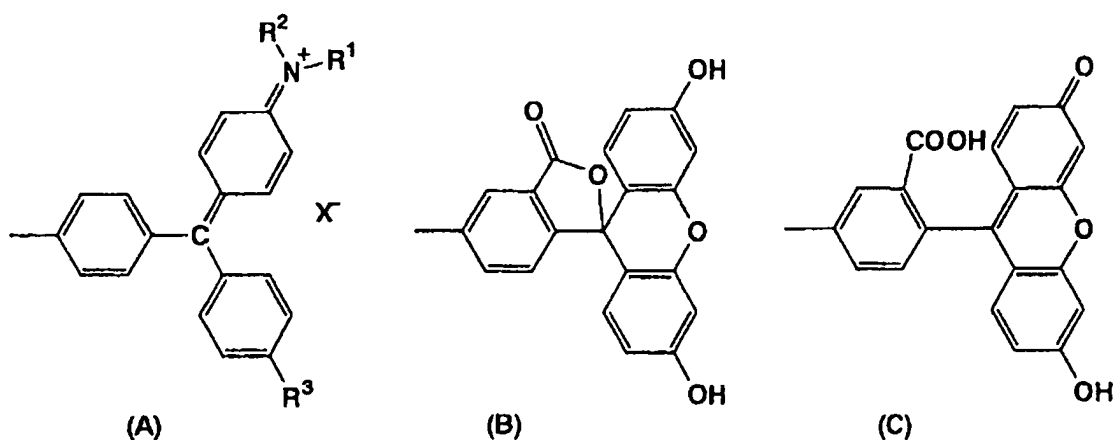
上記一般式(I)で表される化合物又はその塩は、 $IP_3$ 受容体にリガンドとして結合する性質を有しており、例えば、この $IP_3$ 受容体リガンドを $IP_3$ 受容体に結合させた後に光照射することによって $IP_3$ 受容体を変性させることができるので、医薬の有効成分として有用である。

## 請求の範囲

1. 下記の一般式(I) :



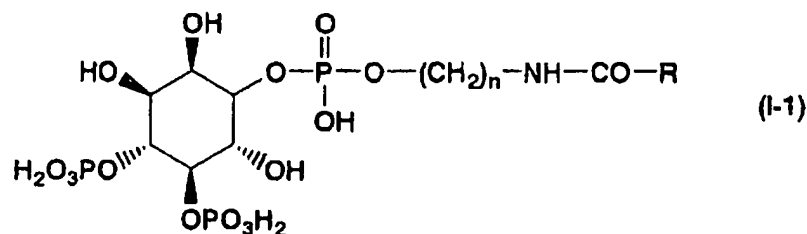
〔式中、R は下記の式 (A)、(B)、又は(C) :



(式中、 $\text{R}^1$  及び  $\text{R}^2$  はそれぞれ独立に  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基を示し、 $\text{R}^3$  はアミノ基、モノ  $\text{C}_{1-6}$  アルキルアミノ基、ジ  $\text{C}_{1-6}$  アルキルアミノ基、又は  $\text{C}_{1-6}$  アルコキシ基を示し、 $\text{X}^-$  はアニオン種を示す) で表される基を示し、 $n$  は 2~5 の整数を示す) で表される化合物又はその塩。

2. 一般式(I)で表される化合物が下記の式(I-1) :





(式中の定義は上記と同義である)で表される化合物である請求の範囲第1項に記載の化合物又はその塩。

3. Rが上記の式(A) (式中、 $R^1$  及び  $R^2$  がメチル基であり、 $R^3$  がジメチルアミノ基であり、Xが塩素イオンである)で表される基であり、nが3である請求の範囲第1項又は第2項に記載の化合物又はその塩。

4. 請求の範囲第1項ないし第3項に記載の化合物又はその塩を含む  $IP_3$  受容体リガンド。

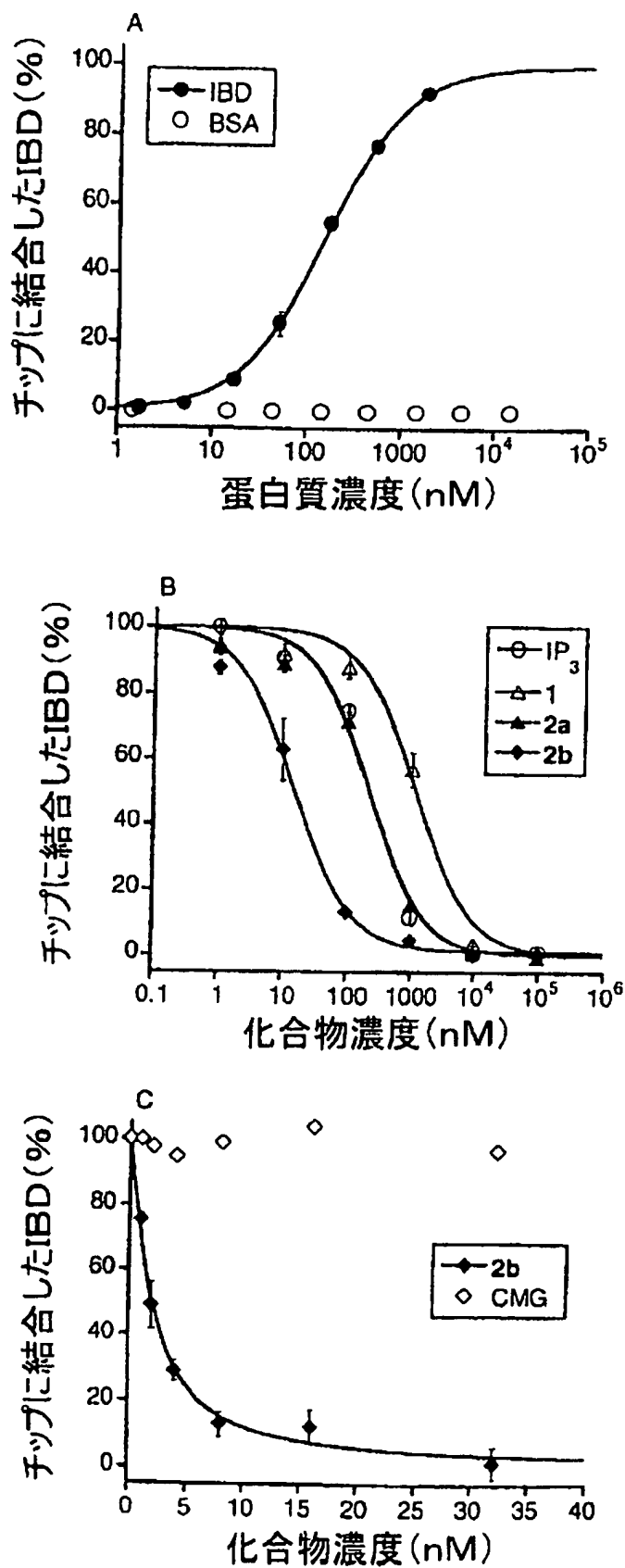
5. 請求の範囲第1項ないし第3項に記載の化合物又はその塩を  $IP_3$  受容体に結合させた後に光照射する工程を含む  $IP_3$  受容体の変性方法。

6. 請求の範囲第5項に記載の方法により  $IP_3$  受容体を変性させた細胞又は細胞抽出液。

7. 請求の範囲第1項ないし第3項に記載の化合物又はその塩を含む  $IP_3$  受容体の変性用試薬。

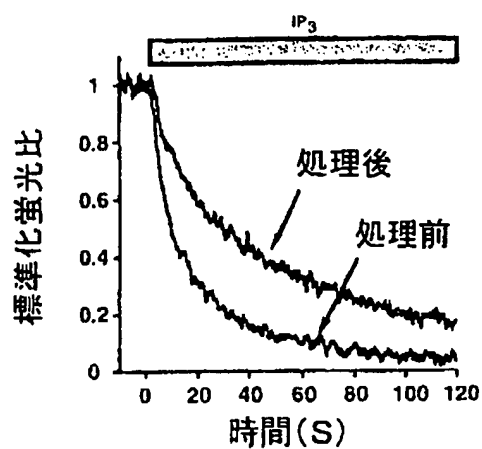
8. 請求の範囲第1項ないし第3項に記載の化合物又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含む医薬。

## 第1図

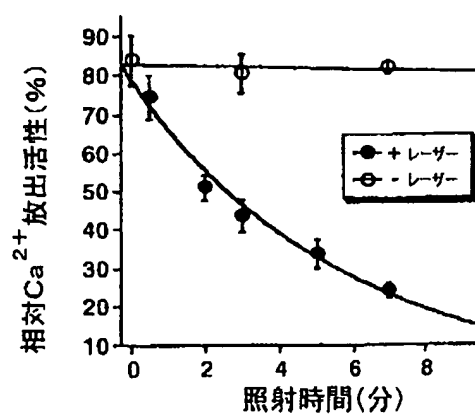


## 第2図

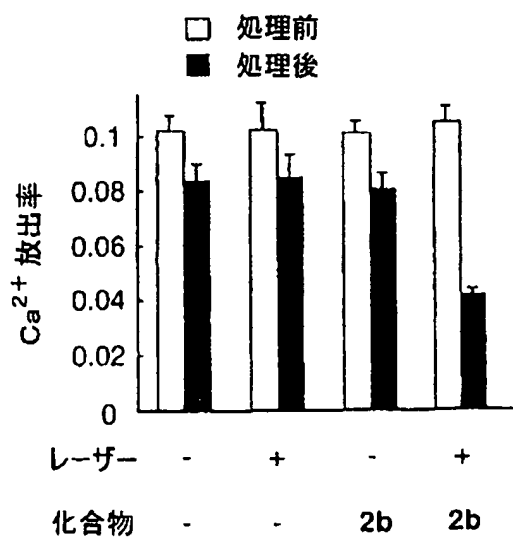
A



B



C



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl.<sup>7</sup> C07F9/144, C07F9/655, C07F9/6561, C07D493/10, A61K31/661, A61K41/00, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C07F9/144, C07F9/655, C07F9/6561, C07D493/10, A61K31/661, A61K41/00, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	INOUE, Takanari et al., "Synthesis and evaluation of 1-position-modified inositol 1,4,5-trisphosphate analogs", Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, Vol.9 No.12, pp.1697-1702	1-8
A	PRESTWICH, Glenn D. et al., "Tethered IP3. Synthesis and biochemical applications of the 1-O-(3-aminopropyl) ester of inositol (1,4,5)-trisphosphate", J. Am. Chem. Soc., 1991, Vol.113, No.5, pp.1822-1825	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 August, 2000 (22.08.00)

Date of mailing of the international search report  
12 September, 2000 (12.09.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 1 C07F9/144, C07F9/655, C07F9/656, C07D493/10, A61K31/661, A61K41/00, A61P43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 1 C07F9/144, C07F9/655, C07F9/656, C07D493/10, A61K31/661, A61K41/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	INOUE, Takanari et al., "Synthesis and evaluation of 1-posit ion-modified inositol 1,4,5-trisphosphate analogs", Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, Vol.9 No.12, p.1697-1702	1 ~ 8
A	PRESTWICH, Glenn D. et al., "Tethered IP3. Synthesis and bi ochemical applications of the 1-0-(3-aminopropyl) ester of i nositol (1,4,5)-trisphosphate", J. Am. Chem. Soc., 1991, Vol.113 No.5, p.1822-1825	1 ~ 8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.08.00

国際調査報告の発送日

12.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本堂 裕司

印

4H

9049

電話番号 03-3581-1101 内線 3443